

DOMATESTE BULUNAN KAROTENOİDLERDEN OLAN LİKOPENİN PROBİYOTİK BAKTERİLER İLE ETKİLEŞİMLERİ

Ebru Köroğlu¹, Hasan Ufuk Çelebioğlu^{1*}

¹ Bartın Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, 74100, BARTIN

Öz

İnsanların doğal ve besleyici gıdalara olan ilgisi son yıllarda iyice artmıştır. Günümüzde meyve ve sebzeler sadece beslenme amacının dışında hastalıklardan korunmak, sağlıklı yaşamak, ve tedavi edici özellikleri de göz önüne alınarak tüketilmektedir. Bu nedenle meyve ve sebzeler, içerikleri bakımından da tercih edilmektedir. Domatesten (*Solanum lycopersicum*) adını alan likopen, başta domates olmak üzere çeşitli bitkilerde bulunan kırmızı renkli karotenoid bir pigmenttir. Likopen *in vitro* ortamlarda güçlü bir antioksidan özellik gösterir, *in vivo* ortamlarda ise DNA, protein ve lipitlerin oksidasyonuna karşı koruyucu olmasının yanı sıra kanser tedavisinde apoptozu indüklemek, DNA hasarını azaltmak, oksidatif stresi önlemek, metastazı azaltmak ve kanser hücre siklusunu bozmak gibi çok hedefli aktiviteleri de bulunmaktadır.

Lactobacillus acidophilus ve *Lacticaseibacillus rhamnosus*, probiyotikler arasında çok çalışılan, popüler mikroorganizmalar arasındadır. Özellikle sindirim sisteminde, *Lactobacillus acidophilus* ve *Lacticaseibacillus rhamnosus* gibi probiyotik bakterilerin varlığı, bağırsak florasını olumlu yönde etkileyerek sindirimi kolaylaştırabilir ve bağışıklık sisteminin güçlenmesine yardımcı olabilir. Bu probiyotiklerin yararlı etkileri, bitkisel kaynaklı bileşiklerle ve vücudumuzdaki faydalı mikroorganizmalarla etkileşimleri sayesinde artabilir.

Bu çalışmanın amacı insan diyetinde yer alan meyve ve sebzelerde doğal olarak bulunan ve birçok yararlı etkisiyle birlikte likopenin insan sağlığı için önemli olan probiyotik bakteriler *Lacticaseibacillus rhamnosus* ve *Lactobacillus acidophilus* üzerine etkilerini araştırmaktır.

Çalışmada, probiyotik bakteriler üzerinde etkileşim gösteren likopenin bakteriyel gelişim kinetiği, bakteriyel otoagregasyon, bakteriyel yüzey hidrofobisitesi ve mukus adezyon testi üzerine araştırma yapılmıştır.

Çalışma sonuçları, likopenin probiyotik bakterilerin yüzey hidrofobisitesinde ve mukus adezyon testinde önemli bir değişikliğe sebep olmadığını, otoagregasyon özellikleri üzerinde doza bağlı artışların olduğunu göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Adezyon, karotenoid, laktik asit bakterileri, likopen, probiyotik.

INTERACTIONS OF LYCOPENE, A CAROTENOID FOUND IN TOMATO, WITH PROBIOTIC BACTERIA

Extended Abstract

People's interest in natural and nutritious foods has increased in recent years. Today, fruits and vegetables are consumed not only for nutritional purposes, but also for protection from diseases, healthy living, and therapeutic properties. For this reason, fruits and vegetables are also preferred in terms of their content. Lycopene, named after tomato (*Solanum lycopersicum*), is a red carotenoid pigment found in various plants, especially tomatoes. Lycopene shows strong antioxidant properties *in vitro*, and *in vivo*, in addition to being protective against oxidation of DNA, proteins and lipids, it also has multi-targeted activities such as inducing apoptosis, reducing DNA damage, preventing oxidative stress, reducing metastasis and disrupting cancer cell cycle in cancer treatment.

Lactobacillus acidophilus and *Lacticaseibacillus rhamnosus* are among best researched and popular microorganisms among probiotics. Especially in the digestive system, the presence of probiotic bacteria such as *Lactobacillus acidophilus* and *Lacticaseibacillus rhamnosus* can positively affect the intestinal flora, facilitate digestion and help strengthen the immune system. The beneficial effects of these probiotics may be enhanced by

*Sorumlu Yazar (Corresponding Author):

Hasan Ufuk CELEBIOĞLU; Bartın University, Faculty of Science, Department of Biotechnology 74100, Bartın-Turkey.

Geliş (Received) : 27.03.2023

Kabul (Accepted) : 28.04.2023

Basım (Published) : 31.07.2023

their interaction with plant-derived compounds and beneficial microorganisms in our body. Thus, the aim of this study is to investigate the effects of lycopene, which is naturally found in fruits and vegetables in the human diet and has many beneficial effects, on probiotic bacteria *Lacticaseibacillus rhamnosus* and *Lactobacillus acidophilus*, which are important for human health. For this, we investigated the effects of lycopene on bacterial growth kinetics, bacterial autoaggregation, bacterial surface hydrophobicity and mucus adhesion of the probiotic bacteria.

The results showed that lycopene did not cause a significant change in the surface hydrophobicity and mucus adhesion of probiotic bacteria. On the other hand, there were dose-related increases on the autoaggregation properties of these probiotic bacteria. In conclusion, it has been observed that different concentrations of lycopene may have different effects on probiotic bacteria. The results also support the hypothesis that carotenoids may influence the physiological effects of probiotic bacteria in a dose-dependent manner.

Keywords: Adhesion, carotenoid, lactic acid bacteria, lycopene, probiotics.

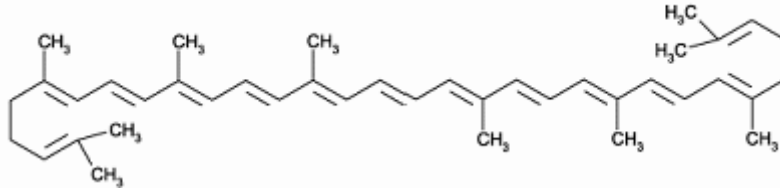
1. Giriş

Karotenoidler bakteri, alg, mantarlar ve bitkiler tarafından sentezlenen, hayvanlar ve insanlar tarafından sentez edilemeyip diyet aracılığıyla alınan bileşiklerdir (Tapiero vd., 2004). Karotenoidlerin bitkilerde bilinen 600 formu bulunmaktadır ve bitkilere farklı renkler sağlamaktadırlar. Ayrıca meyve ve sebzelerde sarıdan kırmızıya kadar değişen renkleri veren pigmentli bileşikler ailesidir (Cadenas & Packer, 1996).

İnsanların diyetinde ve plazmasında en yaygın olarak bulunan karotenoidler arasında likopen, α -karoten, β -karoten, lutein, β -kriptoksantin ve α - tokoferol yer almaktadır (Giovannucci, 2002; Karadas vd., 2006; Sahin vd., 2010). Karotenoid ailesinin bir üyesi olan likopen en fazla domates (*Lycopersicon esculentum*)’te bulunmakta, bunun yanı sıra kuşburnu, papaya, karpuz, pembe greyfurt gibi meyve ve sebzelerde fazla miktarda bulunmaktadır (Giovannelli vd., 2002; Yaping vd., 2002). Domatesteki likopen miktarı, domatesin çeşitliliğine ve olgunluğuna bağlı olarak değişmektedir. Likopen, taze domatesteki protein ve liften oluşan bir matrikste bulunmaktadır fakat domatesin işlem gördüğü ürünlerde ısı ile işlemden kaynaklı olarak hücre duvarlarının parçalanması sonucu serbest kalmakta ve mide-bağırsak kanalı boyunca emilmektedir. Dolayısıyla domates ürünlerinde likopen oranı, taze domates konsantrasyonuna göre daha yüksektir (Parker, 1996; Hakala & Heionen, 1994). Yağda çözünen karotenler grubuna dahil olan likopen, hekzan, benzen, kloroform ve metilenklorid gibi organik çözücüler tarafından çözünebilmekte (Vasapollo vd., 2003) ancak metanol, etanol ve suda çözünmemektedirler (Grossman vd., 2004). Domates ve bazı domates ürünlerinin likopen içerikleri Tablo 1’de, likopenin kimyasal yapısı ise Şekil 1’de verilmiştir.

Tablo 1. Domates ve domates ürünlerinin likopen içerikleri (Hobson & Grierson, 1996).

Domates ve Domates Ürünleri	Likopen İçeriği ($\mu\text{g/g}$ yaş ağırlık)
Domates	8.8-42.0
Isıl İşlem Görmüş Domates	37.0
Domates Suyu	50.0-116.0
Salça	54.0-1500.0
Domates Sosu	62.0
Domates Çorbası	79.9
Ketçap	99.0-134.4
Pizza Sosu	127.1
Domates Tozu	1126.3-1264.9



Şekil 1. Likopenin Kimyasal Yapısı

Probiyotikler, insan sağlığını olumlu yönde etkileyen canlı mikroorganizmalar olan bağırsak mikrobiyal dengesini düzenleyen önemli bir gruptur. Laktik asit bakterileri, probiyotik mikroorganizmaların en yaygın ve en önemli grubunu oluşturmaktadır. (Uymaz, 2010). Probiyotik mikroorganizma içeren gıdalar fonksiyonel gıda olarak tanımlanmaktadır ve gıda pazarının önemli bir bölümünü oluşturmaktadır. Tüketici bilincinin artması, dolayısıyla sağlıklı bir yaşam için diyetin öneminin daha iyi kavranması sonucu probiyotik gıdalara olan talep her geçen gün daha da artmaktadır (Çakır, 2003). Bir mikroorganizmanın probiyotik olması için; insan kaynaklı ve sindirime dayanıklı olması, patojeniteye sebep olmaması, sindirim sistemde kısa süreli de olsa yaşayabilmesi, bağırsak yüzeyine tutunabilmesi, antibiyotik direncinin bulunmaması, antimikrobiyal bileşikler üretebilmesi, bağışıklık sistemini uyarması, laktaz aktivitesine sahip olması, vitamin üretebilmesi gibi etkiler gösterebilmesi ve endüstriyel işlemlere dayanıklı olması gerekmektedir (Collins vd., 1998; Dunne vd., 2001; Önal, 2010; Uymaz, 2010; Erem vd., 2013; Kechagia vd., 2013; Çomak-Göçer & Ergin, 2016). Laktik asit bakterileri, gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılmalarının yanı sıra sağlıklı bir insan bağırsak florasının, özellikle *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* türleri, doğal bileşenleridir. *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. paracasei*, *L. acidophilus* ve *L. salivarius* gastrointestinal sistemdeki mukus tabakalarında bulunmakla birlikte probiyotiklerin en çok bilinenleri arasında *L. acidophilus* ve *L. rhamnosus* yer almaktadır (Alp & Ertürkmen, 2017). *L. acidophilus* LA-5, antimikrobiyal maddeler ve organik asitler gibi bileşenler üretmektedir. Bu bileşenler, gıda kaynaklı patojenleri ve bozulmaya neden olan organizmaları inhibe ederek gıdaların bozulmasını önlemektedir. *L. rhamnosus* GG ise, insan vücudundaki asidik ve bazik koşullara uyum sağlama kabiliyeti ile gastrointestinal sistemde ve diğer endüstriyel alanlarda kullanım alanına sahiptir. Ayrıca, laktaz enzimini üretebilir ve bu enzim sayesinde süt ürünlerinde bulunan laktoz şekerini laktik aside dönüştürebilmektedir (Gülgör & Özçelik, 2014).

İnsan diyetinde yer alan meyve ve sebzelerde doğal olarak bulunan likopen, bağırsak mikroflorasına etki ettiği ve insan vücudunda yaygın olarak bulunan karotenoid antioksidanlardan olduğu bilinmektedir. Aynı zamanda likopen, DNA'yı proteinleri ve lipitleri oksidasyona karşı koruyabilme, kanser tedavisinde oksidatif stresi azaltabilme, kronik hastalık riski (kardiyovasküler hastalıklar ve kanser) arasında negatif korelasyon oluşturduğu bilinmektedir (Ozkan vd., 2023). Likopen, bağırsak mikroflorası üzerinde etkili olabilir ve özellikle vücuda yararlı bakteriler için prebiyotik etkiler gösterebilir. Bu çalışma ile doğal karotenoidlerden olan likopenin *L. rhamnosus* GG ve *L. acidophilus* LA-5 üzerine *in vitro* etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaca ulaşmak için, bu probiyotik bakteriler, likopenin farklı konsantrasyonları ile çoğaltılmıştır ve likopenin bakteriyel gelişim kinetiği, bakteriyel otoagregasyonu, bakteriyel yüzey hidrofobisitesi ve mukuz adezyonu üzerine etkileri araştırılmıştır.

2. Materyal-Metot

2.1. Likopen Ekstraksiyonu

Likopen, Periago vd. (2004) geliştirdiği yöntemle göre ekstrakt edildi. Bunun için 1 gr salça, alüminyum folyo ile sarılmış 125 mL'lik bir şişede tartıldı. 1:1:1 oranlarda heksan/aseton/etanol karışımının elli mililitresi, karotenoidleri çözündürmek için şişeye ilave edildi. Numuneler 30 dakika çalkalanacak ve daha sonra 10 mL damıtılmış su eklendi. Solüsyon ayrı bir polar katmana ve likopen içeren polar olmayan bir katmana ayrılmak için bırakıldı. Likopen içeriği, 472 nm'de likopen heksan çözeltisinin absorpsiyonu ölçülerek elde edildi (Sharma & Le Maguer, 1998).

2.2. Probiyotik Bakterilerin Büyütülmesi ve Likopen ile Muamelesi

L. acidophilus ve *L. rhamnosus* bakterileri, aerobik ortamda, çalkalanmadan de Man, Ragosa, Sharpe (MRS) besiyerleri içerisinde, 37°C'de çoğaltıldı. Farklı Kültürler aynı bakteriyel stoktan, likopenin konsantrasyonları 0, 25,50, 100, 250 ve 500 µg/mL olacak şekilde MRS besiyerinde çalkalamasız büyütüldü (Celebioglu vd., 2018).

2.3. Likopenin Probiyotik Bakteri Büyüme Kinetiği Üzerine Etkileri

Bakteriler, bir kontrol grubu ve likopen muamelesi grubu olmak üzere iki gruba ayrıldı. Likopen kontrol grubuna konulmadı (sadece MRS), MRS besiyerinde işlem yapılacak gruplara değişen miktarlarda likopen eklenerek bakterilerin gelişimi her 4 saatte bir 600 nm dalgaboyundaki absorbanlarına bakılarak gözlemlendi. Bakteriyel gelişim kinetikleri bu sonuçlar doğrultusunda çıkarılarak likopenin büyüme kinetiği üzerine etkileri incelendi.

2.4. Bakteriyel Agregasyonun Belirlenmesi

Bakterilerin bağırsak mukozasına adezyonları için bakteriyel agregasyon önem taşımaktadır (Kos vd., 2003). Bakteri hücreleri, duraklama fazında (3200xg, 15 dk) harvest edildi ve PBS ile yıkandıktan sonra OD600 deeri yaklaşık .5 olan bir süspansiyon hazırlandı. Ardından, 4mL bakteriyel süspansiyonlar 10 saniye vorteksenerek falcon tüplerine aktarıldı ve 5 saat boyunca oda sıcaklığındaki inkübasyon sonrası otoagregasyon derecesi belirlendi. Her saat 0.1 mL süspansiyondan alındı ve içine 0.9 mL PBS eklenerek 600 nm'de absorban ölçüldü. Bu veriler kullanılarak otoagregasyon, $1 - (A_t/A_0) \times 100$ ile yüzdelik olarak hesaplandı (A_t , 1., 2., 3., 4, veya 5. saatlerdeki absorban değeri; A_0 , 0. saatteki absorban değerini göstermektedir (Kos vd., 2003).

2.5. Bakterilerin Yüzey Hidrofobitesinin Solventlere Mikrobiyal Adhezyon Yöntemi İle Belirlenmesi

Bakteriler bağırsak mikroflorasının doğal üyeleridir ve yüzey hidrofobitesi diğer yüzeylere bağlanmalarında çok önemli bir rol oynamaktadır. Bakterilerin yüzey hidrofobitesi, Solventlere mikrobiyal adhezyon (MATS) yöntemiyle ölçüldü. Kontrol ve deney gruplarındaki bakteriler duraklama fazında toplandı (3200xg, 15 dk) ve PBS ile yıkandı. Ardından, OD600 yaklaşık 0.5 olan 0.1 M KNO₃ (pH 6.2) süspansiyonu hazırlandı. 1 mL apolar solvent olan ksilen, 3 mL probiyotik süspansiyona eklendi ve oda sıcaklığında 10 dakika boyunca bekletildi. İki fazlı sistem 2 dakika boyunca vorteksenerek karıştırıldı, daha sonra sulu kısım ayrıldı ve oda sıcaklığında 20 dakika daha inkübe edildi. Son olarak absorban ölçüldü (OD₆₀₀) ve yüzey hidrofobitesi $(1 - A_1/A_0) \times 100$ formülü kullanılarak hesaplandı (Kos vd., 2003).

2.6. Mukus Adezyon Testinin Belirlenmesi

Ham müsin PBS'de (1 mg/mL) seyrelti, 200 µL'si plaka kuyucuklarına yüklenerek 4°C'de gece boyunca inkübe edildi (Izquierdo vd., 2009). Bağlanmayan mukus bileşenini çıkarmak için plaka kuyucukları iki kez 200 µL PBS ile yıkandı. Bakteriler, santrifüj edildikten (6000x g, 10 dak, 4C) sonra PBS ile yıkandı. PBS ile süspanse edildikten sonra probiyotik süspansiyon OD₆₀₀ 0,50 ± 0,05 olacak şekilde ayarlandı. Plaka kuyucuklarına 200 µl bakteri süspansiyonu ekildi ve 37°C'de 1 saat boyunca inkübe edildi. Bağlanmayan bakterileri çıkarmak için plaka kuyucukları 200 µL PBS ile yıkanarak plaka kuyucuklarına 200 µl MTT Solüsyonu eklendi ve oda sıcaklığında 3 saat inkübasyona bırakıldı. MTT çözeltisi çıkarılıp kuyucuklara 200 µl DMSO ilave edilip inkübasyona bırakıldı (37°C'de 15 dk). ELISA okuyucu ile 570 nm'de absorbanı ölçüldü ve adezyon, kuyucuklara eklenen bakteri süspansiyonunun absorbanına göre müsinе bağlanan bakterilerin absorban yüzdesi olarak ifade edildi.

2.7. İstatistiksel Analizler

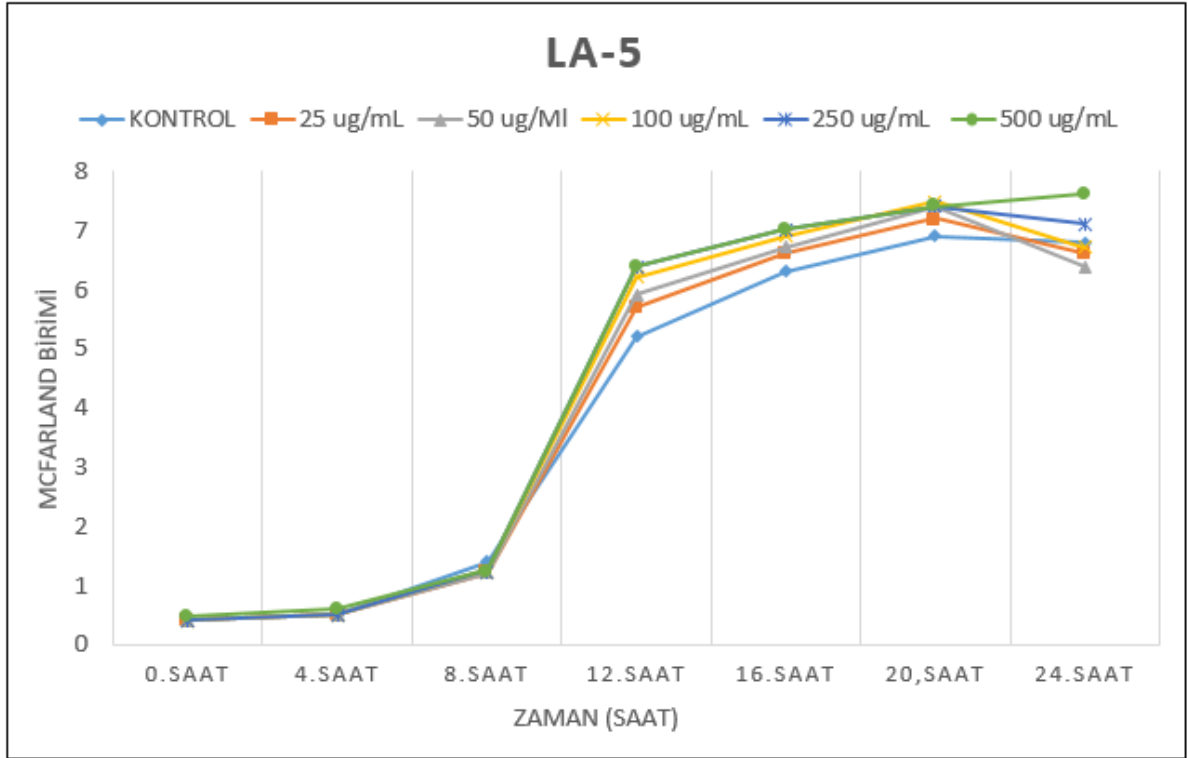
Tüm deneyler, en az 3 biyolojik teknik tekrarlı olarak yapıldı. Muamele grupları ve kontrol grubu arasındaki karşılaştırma, Student'in t-test'i ile yapıldı ve p değerinin 0.05'ten küçük olduğu durumlar, istatistiksel olarak GraphPad Prism ile hesaplandı ve anlamlı olarak kabul edildi.

3. Sonuç ve Tartışma

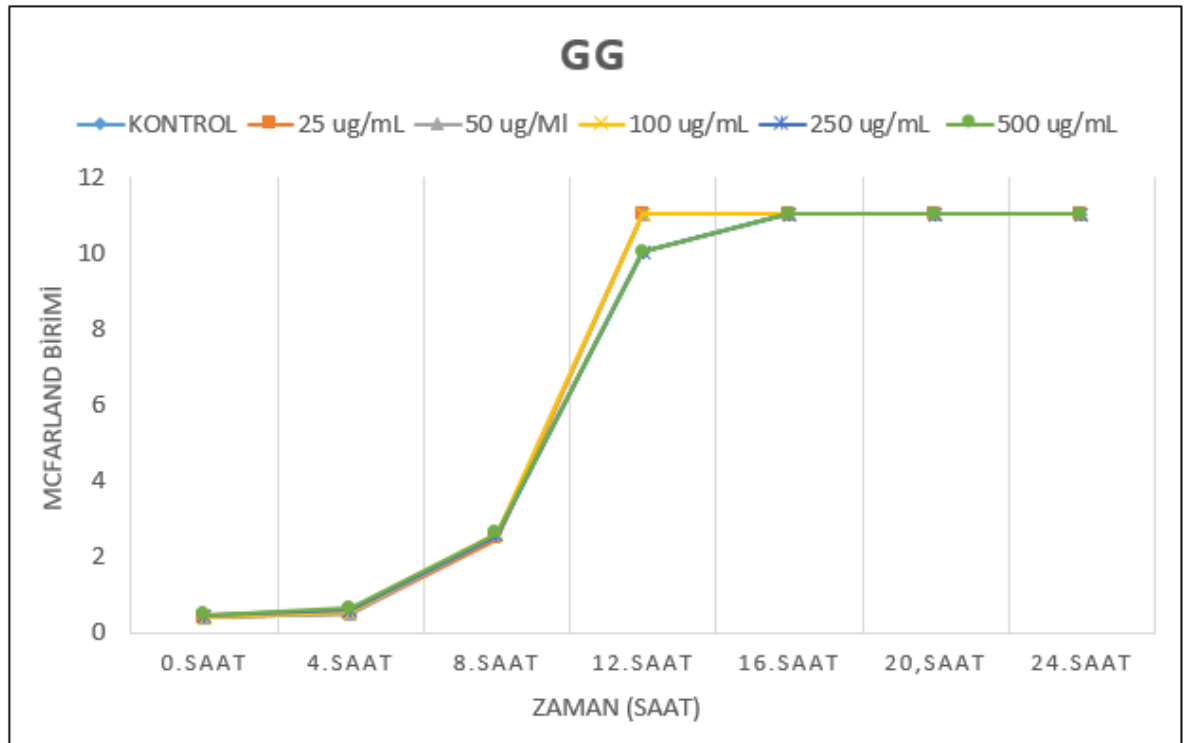
3.1. Bakteriyel Gelişim Kinetiği

Bakteriyel gelişim kinetiğinde, bakterilerin büyüme ortamına uyum sağlayıp çoğalmaya başlayana kadar belirli bir süre geçmesi gerekmektedir. Bu süre içerisinde besi ortamına aşılınmış bakterilerin ne kadar büyüdükleri incelenmektedir (Mousavi vd., 2011, Charalamopoulos vd., 2002).

Bizim çalışmamızda likopen ile ekstrakt edilmiş olan probiyotik bakterilerin gelişiminde herhangi bir olumsuz etki göstermemiştir (Şekil 2 ve 3).



Şekil 2. Likopenin *L. acidophilus* LA-5 bakterilerinin bakteriyel gelişim kinetiği üzerine etkileri.



Şekil 3. Likopenin *L. rhamnosus* GG bakterilerinin bakteriyel gelişim kinetiği üzerine etkileri.

3.2. Otoagregasyon

Mikroorganizmaların epitel yüzeylere bağlanması, hücre yüzeyinin hem agregasyon hem de hidrofobiklik özelliği ile ilgilidir. Yararlı etkileri ortaya çıkarmak için, probiyotikler agregasyon yolu ile belirli bir kütleye ulaşması gerekmektedir. Otoagregasyon, aynı türdeki probiyotik bakterilerin insan gastrointestinal sistemdeki epitel hücrelere kümeler halinde yapışmasını göstermektedir (Sui vd. 2021, Pradhan vd. 2020, Satyanarayana vd. 2019).

Otoagregasyon sonuçlarına baktığımız zaman *Lactobacillus acidophilus* LA-5'i kontrol grubuna göre konsantrasyonları kıyasladığımız zaman 2,5 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL (4. saat hariç), 25 µg/mL (2 ve 3. saat hariç), 50 µg/mL (1,3,4 ve 5. saatler hariç) istatistiksel olarak anlamlı bir ($p < 0.05$) agregasyon özelliği göstermiştir (Tablo 2).

Tablo 2. Likopenin *L. acidophilus* LA-5 bakterisinin otoagregasyonu üzerine etkileri. Değerler ortalama yüzdelik \pm Standart sapma olarak verilmiş, sonuçlar Student's t-test ile analiz edilmiştir. Yıldız (*), kontrol grubuna göre $p < 0,05$

	1. saat	2. saat	3. saat	4. saat	5. saat
Kontrol (0 µg/mL)	35,1 \pm 2,6	6,9 \pm 4,7	27,9 \pm 4,4	39,5 \pm 17,1	50,1 \pm 0,7
25 µg/mL	0 *	0 *	0 *	11,3 \pm 9,1 *	0 *
50 µg/mL	0 *	0 *	0 *	15,0 \pm 3,6 *	7,8 \pm 2,5 *
100 µg/mL	15,9 \pm 3,9 *	0 *	0 *	25,2 \pm 20,1	35,1 \pm 0,7 *
250 µg/mL	6,6 \pm 1,0 *	3,0 \pm 9,8	10,5 \pm 9,6	13,3 \pm 0,9 *	24,9 \pm 1,1 *
500 µg/mL	38,5 \pm 1,9	66,3 \pm 0,2 *	15,3 \pm 10,8	23,4 \pm 9,0	49,1 \pm 0,1

Lactobacillus rhamnosus GG'i kontrol grubu ile konsantrasyonları kıyasladığımız zaman 5 µg/mL'nin 1. saatinde, 25 µg/mL'nin 1. saatinde ve 50 µg/mL'nin 5. saatinde istatistiksel olarak anlamlı bir ($p < 0.05$) agregasyon özelliği bulunmuştur (Tablo 3).

Tablo 3. Likopenin *L. rhamnosus* GG bakterisinin otoagregasyonu üzerine etkileri. Değerler ortalama yüzdelik \pm Standart sapma olarak verilmiş, sonuçlar Student's t-test ile analiz edilmiştir. Yıldız (*), kontrol grubuna göre $p < 0,05$

	1. saat	2. saat	3. saat	4. saat	5. saat
kontrol (0 µg/mL)	4,6 \pm 0,5	15,2 \pm 10,2	51,0 \pm 4,6	59,3 \pm 9,6	60,5 \pm 4,6
25 µg/mL	4,2 \pm 0,8	10,4 \pm 4,0	51,6 \pm 6,3	40,6 \pm 7,0	49,2 \pm 19,7
50 µg/mL	19,9 \pm 11,8 *	30,8 \pm 23,8	54,1 \pm 6,7	60,3 \pm 5,0	62,2 \pm 14,4
100 µg/mL	1,9 \pm 1,9	9,5 \pm 4,8	53,3 \pm 2,1	52,5 \pm 4,1	65,1 \pm 6,3

250 µg/mL	18,3 ± 2,2 *	36,9 ± 22,8	51,5 ± 5,9	50,3 ± 3,7	62,4 ± 6,9
500 µg/mL	11,8 ± 7,2	21,0 ± 10,7	48,9 ± 6,8	65,5 ± 3,2	71,2 ± 5,2 *

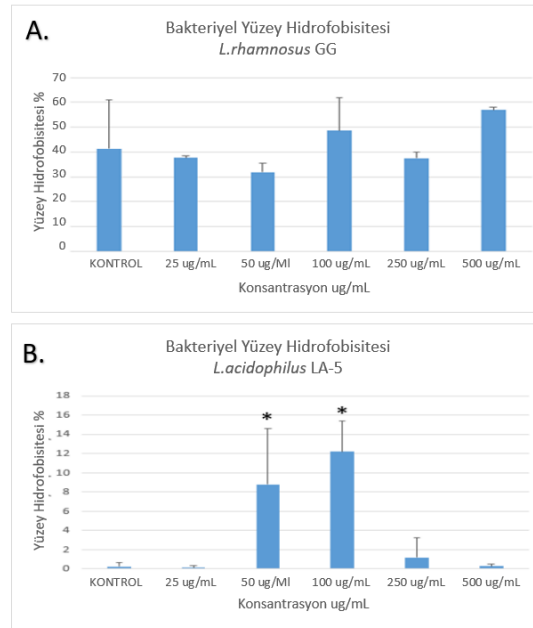
Yapılan çalışmaları incelediğimiz zaman, Sui ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada fermente edilmiş mandalina sirkesinden elde ettikleri LAB suşu olan *L. plantarum* NF4'ün otoagregasyon ve koagregasyon'un yüksek derecede etkili olduğu gösterilmiştir (Sui vd., 2021). Rodríguez Sánchez ve arkadaşlarının yaptığı diğer bir çalışmada ise, çeşitli gıda ürünlerinden elde ettikleri probiyotik suşları üzerinde inceleme yapmışlardır. Araştırmalarında elde ettiklerin suşları 2 saat ve 4 saat olarak otoagregasyon etkileri değerlendirilmiştir. Elde edilen suşların yaklaşık olarak %93,8' e kadar otoagregasyon etkisi olduğunu göstermişlerdir (Rodríguez-Sánchez vd., 2021).

3.3.YüzeY Hidrofobisitesi

Hidrofobisite probiyotiklik için önemli bir özellik olarak kabul edilmektedir. Çünkü probiyotikler, epitel yüzeye yapıştıklarında bağırsakta kararlı bir şekilde işlev görebilirler. Bazı *Lactobacillus* suşlarında yapışma ile hidrofobiklik arasında ilişki olduğunu gözlemlemişlerdir (Kos vd., 2003, Sakoui vd., 2022).

Ayrıca yüzey hidrofikliğı ne kadar fazla ise yararlı bakterilerin bağırsak mukozosına bağlanma olasılığı o kadar yüksektir (Laparra & Sanz, 2009; Van Tassell & Miller, 2011).

Hidrofobisite sonuçlarında *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG bakteri kontrol grubu ile kıyaslandığı zaman herhangi bir anlamlı değer elde edilememiştir (Şekil 4A). *Lactobacillus acidophilus* LA-5, kontrol grubu ile kıyasladığımız zaman sadece 5 µg/mL ve 10 µg/mL'sinde istatistiksel olarak anlamlı bir (p<0.05) artış elde edilmiştir (Şekil 4B).



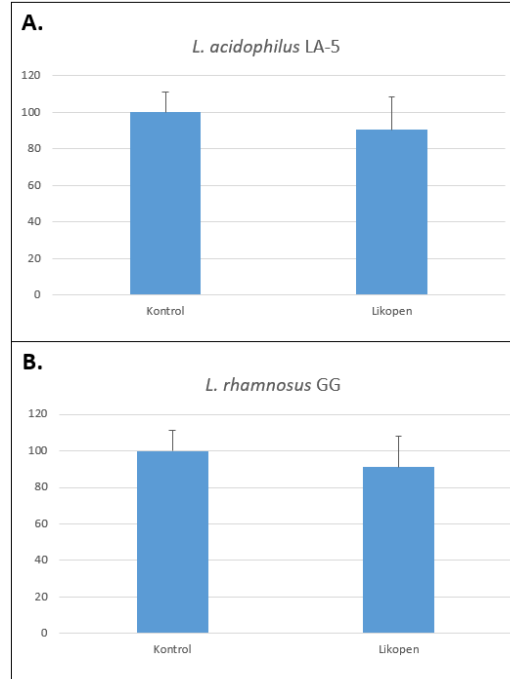
Şekil 4. Likopenin *L. acidophilus* LA-5 (A.) ve *L. rhamnosus* GG (B.) bakterilerinin yüzey hidrofobisitesi üzerine etkileri. Sonuçlar Student's t-test ile analiz edilmiştir. Yıldız (*), kontrol grubuna göre p<0,05

Yapılan çalışmalara baktığımız zaman, Siahmazgı geleneksel peynirinden izole edilen *L. plantarum* suşları için % 6.58 ile 73.3 hücre hidrofobiklikliğı görülmüştür (Gandomi vd., 2019). Yapılan başka bir çalışmada ise quercetin ile muamele edilmiş olan *Lactobacillus acidophilus* ve *Lacticaseibacillus rhamnosus* bakterileri üzerinde her muamele gruplarının kontrol grubuna göre anlamlı değişiklikler olmadığını göstermişlerdir (Koroglu & Celebioglu, 2019).

3.4. Mukus Adezyon

Bağırsak epitellerini kaplayan mukus, mikroorganizmalar için bağırsaktaki ilk yüzeysel temas yeridir (Önal & Aslım, 2005). Probiyotikler, bağırsak sağlığını geliştirmesi, gıdanın besin değerini artırması gibi özelliklerinin yanı sıra enfeksiyonların önlenmesinde antibakteriyel maddelerin üretimi, patojenlerin epitel ve mukozal yüzeylere adezyonlarının engellenmesi gibi birçok mekanizma bulunmaktadır (Wan vd., 2016). Ayrıca bağırsaklardaki mukus tabakasının bariyer özelliklerini olumlu olarak artırarak da patojenlerin konak hücrelere adezyonunu önleyebilirler (Hemaiswarya vd., 2013).

Mukus adezyon sonuçlarına baktığımız zaman yapılan istatistiksel analizlere göre (Student's *t*-test) anlamlı bir değişiklik bulunamamıştır (Şekil 5).



Şekil 5. Likopenin *L. acidophilus* LA-5 (A.) ve *L. rhamnosus* GG (B.) bakterilerinin mûsin adezyonu üzerine etkileri.

Bu çalışmada karotenoidler arasında yer alan likopenin ekstraksiyonu gerçekleştirilerek probiyotik bakteriler olan *L. acidophilus* La-5 ve *L. rhamnosus* GG bakterisi üzerinde etkileri incelenmiştir. Salçadan ekstrakte edilen likopenin 417 nm'de spektrum ölçümü alınmıştır ve spektrum değerinin 3,526 olduğu bulunmuştur. Elde edilmiş olan likopenin, bakteriyel gelişim kinetiği, bakteriyel otoagregasyonu, bakteriyel yüzey hidrofobitesisi ve mukus adezyon testleri yapılmıştır.

Karotenoidler intestinal sistemde diyet yağı ya da yağda çözünen vitaminler gibi emildiği bilinmektedir. Doğada yaklaşık olarak 700'e yakın karotenoid olduğu bilinmektedir ve likopen de bu karotenoidler arasında yer almaktadır (Shete & Quadro, 2013).

Probiyotikler arasında yer alan laktik asit bakterilerinin temel özellikler arasında, bağırsak ekosisteminde hayatta kalabilme, işleme ve depolama sırasında yaşayabilirlik, ve konakçının bağırsak epiteline yapışma gibi faktörler yer almaktadır. Ayrıca, gastrointestinal sistemdeki kolonizasyonun, probiyotik bakteriler için önemli bir özellik gösterdiği bilinmektedir (Alander vd., 1997; Yürümez & Aydın Osmanağaoğlu, 2011). Probiyotiklerin, yeterli miktarda alındığında, yararlı ve potansiyel olarak zararlı mikroorganizmalar arasında sağlıklı bir denge oluşturabildiği düşünülmektedir. Bu denge, bağırsak mikroflorasının sağlıklı olması için son derece önemlidir. Laktobasiller, bağırsakta çeşitli şekillerde etki göstererek sindirim sistemini ve bağışıklık sistemini destekleyebilir. Bunun yanı sıra, probiyotiklerin diğer faydalı etkileri arasında bağırsak hareketliliğini artırma, besin emilimini düzenleme ve enfeksiyonlara karşı koruma yer almaktadır (Tannock, 1999; Kumari vd., 2018).

İnsan bağırsağında probiyotiklerin aktivitelerini gerçekleştirmesi büyük önem taşımaktadır (Jankovic vd., 2003). Otoagregasyonda ise aynı suşa ait mikroorganizmanın bağırsak epiteline yapışmasında büyük önem arz etmektedir. Bakteriyel yapışma, ilk aşamada iki yüzey arasındaki spesifik olmayan fiziksel etkileşimlere dayanmaktadır. Ancak daha sonra proteinler ve tamamlayıcı reseptörler arasında spesifik etkileşimler sağladığı da bilinmektedir. Bu spesifik etkileşimler, bakterilerin diğer organizmalarla ya da yüzeylere daha sağlam bir bağ oluşturmaya ve daha güçlü bir şekilde tutunmasına olanak tanımaktadır. Bakteriyel yapışma, enfeksiyonların oluşmasında ve probiyotiklerin bağırsaklarda kolonizasyonunda önemlidir (Rojas & Conway, 1996). Bu çalışmanın sonuçlarına genel olarak baktığımız zaman otoagregasyonun fazla olmasının, bakterilerin daha iyi adezyon etkisi göstereceği düşünülmektedir. *Lactobacillus acidophilus* LA-5 bakterilerinin hemen hemen her konsantrasyonunda mukozaya iyi yapışabileceği, *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG bakterisinin ise sadece 5 µg/mL ve 25 µg/mL üzerinde mukozaya yapışma etkisi gösterebileceğine olanak verebilir.

Bağırsak mikrobiyotasının oluşumu ve dengesi için, bakterilerin bağırsak epiteline mukozal yüzeye tutunması ve kolonizasyonu oldukça önemlidir. Bu konu ile ilgili yapılan araştırmalar, bakterilerin bu tutunma ve kolonizasyon özelliklerinin, probiyotik etkilerinde bağırsak sağlığı için etkili olduğunu göstermektedir (Yürümez & Aydın Osmanağaoğlu, 2011). Araştırma sonuçları, probiyotik bakterilerin bağırsak epiteline ve mukozal yüzeye tutunmasında yüzey hidrofobisitesinin önemli bir faktör olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, yüzey hidrofobisitesinin artırılması, probiyotik bakterilerin bağırsak epiteline daha iyi tutunmasına yardımcı olabilir. Bu çalışmada ise, *L.rhamnosus* GG bakterilerinin likopen konsantrasyonundaki hidrofobisite de anlamlı değer elde edilememesi, adezyonda biraz zayıf kalabileceği düşünülebilir. Öte yandan, *L. acidophilus* LA-5'nin ise 5 µg/mL ve 10 µg/mL'de hidrofobisite artışı mukozaya adezyonu konusunda pozitif etki gösterebilir.

Mukus adezyon testinde ise; elde edilen verilere göre hem *Lactobacillus acidophilus* hem de *Lacticaseibacillus rhamnosus* bakterileri üzerinde anlamlı bir değişiklik bulunmamıştır.

Bakterilerin mukozaya tutunmalarında, yüzey katmanındaki proteinlerin önemi bilinmektedir. Likopenin de bu proteinlerin ekspresyonu üzerindeki etkilerinin de ortaya çıkarılması gerekmektedir. Ayrıca adezyon çalışmaları ile de araştırma desteklenmelidir. Sonuç olarak, likopenin farklı konsantrasyonlarının, probiyotik bakteriler üzerine farklı etkileri olabileceği görülmüştür. Sonuçlar, karotenoidlerin probiyotik bakterilerin fizyolojik etkilerini doza bağımlı olarak etki edebileceği hipotezini desteklemektedir.

Teşekkür: Bu çalışma, TÜBİTAK 2209-A Üniversite Öğrencileri Araştırma Projeleri Destekleme Programı (1919B011902509) tarafından destek almıştır. Probiyotik suşlar için Chr. Hansen Türkiye'ye teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Alander, M., Korpela, R., Saxeline, M., Vilpponen Salmela, T., Matilla Sandholm, T. & Wright, A. (1997). Recovery of *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG from human colonic biopsies, *Letters in Applied Microbiology*, 24, 363-364.
2. Alp, D. & Ertürkmen, P. (2017). Probiyotik olarak kullanılan *Lactobacillus* spp. suşlarının kolesterol düşürücü etkileri ve olası mekanizmalar. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 8(1), 108-113.
3. Cadenas, E. & Packer, L. (1996). Handbook of antioxidants. Marcel Dekker. Inc. New York
4. Charalampopoulos, D., Pandiella, S.S. & Webb, C. (2002). Growth studies of potentially probiotic lactic acid bacteria in cereal-based substrates. *Journal of applied microbiology*, 92(5), 851-859.
5. Collins, J.K., Thornton, G. & Sullivan, G.O. (1998). Selection of probiotic strains for human applications. *International Dairy Journal*, 8, 487-490.
6. Çakır, İ. (2003). *Lactobacillus* ve *Bifidobakter*lerde bazı probiyotik özelliklerin belirlenmesi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 86 s.
7. Celebioglu, H.U., Delsoglio, M., Brix, S., Pessione, E. & Svensson, B. (2018). Plant polyphenols stimulate adhesion to intestinal mucosa and induce proteome changes in the probiotic *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Molecular Nutrition & Food Research*, 62(4), 1700638.
8. Çomak-Göçer, E.M.Ç., Ergin, F. & Küçükçetin, A. (2016). Sindirim sistemi modellerinde probiyotik mikroorganizmaların canlılığı. *Akademik Gıda*, 14 (2), 158-165.

9. Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., Feeney, M., Flynn, S., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., O'Sullivan, G.C., Shanahan, F. & Collins, J.K. (2001). *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: Correlation with *in vivo* Findings. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 386S-92S.
10. Erem, F., Küçükçetin, A. & Certel, M. (2013). *Bacillus* türlerinin probiyotik olarak değerlendirilmesi. *gıda*, 38 (4), 247-254.
11. Gandomi, H., Farhangfar, A., Akhondzadeh Basti, A., Misaghi, A. & Noori, N. (2019). Auto and co-aggregation, hydrophobicity and adhesion properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Siahmazgi traditional cheese. *Food & Health*, 2(1), 1-5.
12. Giovanelli, G., Zanoni, B., Lavelli, V. & Nani, R. (2002). Water sorption, drying and antioxidant properties of dried tomato products. *Journal of Food Engineering*, 52, 135-41.
13. Giovannucci, E. (2002). A review of epidemiologic studies of tomatoes, lycopene and prostate cancer. *Experimental Biology and Medicine*, 227, 852-859.
14. Grossman, A.R., Lohr, M. & Im, C.S. (2004). *Chlamydomonas reinhardtii* in the landscape of pigments. *Annual Review of Genetics*; 38, 119–173.
15. Gülgör, G. & Özçelik, F. (2014). Bakteriyosin Üreten Laktik Asit Bakterilerinin Probiyotik Amaçlı Kullanımı, *Akademik Gıda*, 12(1), 63–68.
16. Hakala, S.H. & Heinonen, I.M. (1994). Chromatographic purification of natural lycopene. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 13141316.
17. Hemaiswarya, S., Raja, R., Ravikumar, R. & Carvalho, I.S. (2013). Mechanism of action of probiotics. *Brazilian archives of Biology and technology*, 56(1), 113-119.
18. Hobson, G. & Grierson, D. (1996). Tomato, 403-414, *Biochemistry of Fruit Ripening*, Seymour, G.B., Taylor, J.E. and Tucker, G.A. (Eds.), Chapman and Hall, London.
19. Izquierdo, E., Horvatovich, P., Marchioni, E., Aoude-Werner, D., Sanz, Y. & Ennahar, S. (2009). 2-DE and MS analysis of key proteins in the adhesion of *Lactobacillus plantarum*, a first step toward early selection of probiotics based on bacterial biomarkers. *Electrophoresis*, 30(6), 949-956.
20. Jankovic, I., Ventura, M., Meylan, V., Rouvet, M., Elli, M. & Zink, R. (2003). Contribution of aggregation-promoting factor to maintenance of cell shape in *Lactobacillus gasseri* 4B2. *Journal of Bacteriology* 185, 3288–3296.
21. Karadas, F., Surai, P., Grammenidis, E., Sparks, N.H.C. & Acamovic, T. (2006). Supplementation of the maternal diet with tomato powder and marigold extract: Effects on the antioxidant system of the developing quail. *British Poultry Science*, 47, 200-208.
22. Kechagia, M., Basoulis, D., Konstantopoulou, S., Dimitriadi, D., Gyftopoulou, K., Skarmoutsou, N. & Fakiri, E.M. (2013). Health benefits of probiotics: A Review. *ISRN Nutrition*, 481651, 1-7.
23. Koroglu, E. & Celebioglu H.U. (2019). *In vitro* Interactions of Quercetin, One of Plant Flavonoids, With Probiotic Bacteria *L. acidophilus* LA-5 and *L. rhamnosus* GG, International Marmara Science and Social Sciences Congress (Spring) 2019, 422-428.
24. Kos, B., Suskovic, J., Vukovic, S., Simpraga, M., Frece, J. & Matosic, S. (2003). Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiology*, 94(6), 981-987.
25. Kumari, A., Angmo, K., Monika, S. & Bhalla, T.C. (2018). Functional and technological application of probiotic *L. casei* PLA5 in fermented soymilk. *International Food Research Journal*, 25(5), 2164-2172.
26. Laparra, J.M. & Sanz, Y. (2009). Comparison of *in vitro* models to study bacterial adhesion to the intestinal epithelium. *Letters in Applied Microbiology*, 49(6), 695-701.
27. Mousavi, Z.E., Mousavi, S.M., Razavi, S.H., Emam-Djomeh, Z. & Kiani, H. (2011). Fermentation of pomegranate juice by probiotic lactic acid bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(1), 123-128.
28. Önal, D., Beyatlı, Y. & Aşım, B. (2005). Probiyotik bakterilerin epitel yüzeylere yapışması. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 3(9), 1-10.
29. Önal, D. (2010). Geleneksel Türk peynirlerinde propiyonik asit bakteri türlerinin belirlenmesi ve bazı probiyotik özelliklerinin araştırılması. Doktora Tezi, Biyoloji, Gazi Üniv. Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
30. Ozkan, G., Günal-Köroğlu, D., Karadag, A., Capanoglu, E., Cardoso, S.M., Al-Omari, B., Calina, D., Sharifi-Rad, J. & Cho, W.C. (2023). A mechanistic updated overview on lycopene as potential anticancer agent. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 161, 114428.

31. **Parker, R.S. (1996).** Absorption, metabolism and transport of carotenoids. *FASEB Journal*, 10, 542–551.
32. **Periago MJ, Rincón F, Agüera MD, Ros G. (2004)** Mixture approach for optimizing lycopene extraction from tomato and tomato products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(19), 5796-5802.
33. **Pradhan, D., Mallappa, R.H. & Grover, S. (2020).** Comprehensive approaches for assessing the safety of probiotic bacteria. *Food Control*, 108, 106872.
34. **Rodríguez-Sánchez, S., Fernández-Pacheco, P., Seseña, S., Pintado, C. & Palop, M.L. (2021).** Selection of probiotic *Lactobacillus* strains with antimicrobial activity to be used as biocontrol agents in food industry. *LWT*, 111142.
35. **Rojas, M. & Conway, P.L. (1996).** Colonization by *lactobacilli* of piglet small intestinal mucus. *Journal of Applied Bacteriology*, 81, 474–480.
36. **Sahin, K., Sahin, N. & Kucuk, O. (2010).** Lycopene and chemotherapy toxicity, *Nutrition and Cancer*, 62, 988-995.
37. **Satyanarayana, T., Johri, B.N. & Das, S.K. (Eds.) (2019).** *Microbial Diversity in Ecosystem Sustainability and Biotechnological Applications: Volume 1. Microbial Diversity in Normal & Extreme Environments.* Springer.
38. **Sakoui, S., Derdak, R., Addoum, B., Pop, O.L., Vodnar, D.C., Suharoschi, R. & El Khalfi, B. (2022).** The first study of probiotic properties and biological activities of lactic acid bacteria isolated from Bat guano from Er-rachidia, Morocco. *LWT*, 159, 113224.
39. **Sharma, S.K. & Le Maguer, M. (1996).** Lycopene in tomatoes and tomato pulp fractions. *Italian Journal of Food Science*, 2, 107-113.
40. **Shete, V. & Quadro, L. (2013).** Mammalian metabolism of betacarotene: gaps in knowledge. *Nutrients*, 5 (12),4849-68.
41. **Sui, Y., Liu, J., Liu, Y., Wang, Y., Xiao, Y., Gao, B. & Zhu, D. (2021).** *In vitro* probiotic characterization of *Lactobacillus* strains from fermented tangerine vinegar and their cholesterol degradation activity. *Food Bioscience*, 39, 100843.
42. **Tannock, G.W. (1999).** Analysis of the intestinal microflora: a renaissance. *Antonie Van Leeuwenhoek* 76, 265–278.
43. **Tapiero, H., Townsend, D.M. & Tew, K.D. (2004).** The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 58(2), 100-110.
44. **Uymaz, B. (2010).** Probiyotikler ve kullanım alanları. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 16(1), 95–104.
45. **Van Tassell, M.L. & Miller, M.J. (2011).** *Lactobacillus* adhesion to mucus. *Nutrients*, 3(5), 613-636.
46. **Vasapollo, G., Longo, L., Rescio, L. & Ciurlia, L. (2003).** Innovative supercritical CO₂ extraction of lycopene from tomato in the presence of vegetable oil as co-solvent. *Journal of Supercritical Fluids*, 1-10.
47. **Wan, L.Y.M., Chen, Z.J., Shah, N.P. & El-Nezami, H. (2016).** Modulation of intestinal epithelial defense responses by probiotic bacteria. *Critical reviews in food science and nutrition*, 56(16), 2628-2641.
48. **Yaping, Z., Suping, Q., Wenli, Y, Zheng, X., Hong, S., Side, Y. & Dapu, W. (2002).** Antioxidant activity of lycopene extracted from tomato paste towards trichloromethyl peroxy radical CCl₃O₂. *Food Chemistry*, 77(2), 209-212.
49. **Yürümez, E.Y. & Aydın Osmanağaoğlu, Ö.T.D. (2011).** *Gayta örneklerinden izole edilen bazı laktik asit bakterilerinin probiyotik özellikleri* (Doctoral dissertation, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı).